

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucia Molnárová

Porovnanie účinnosti extrakcie selénu z potravinových doplnkov

Porovnání účinnosti extrakce selenu z potravinových doplňků

Comparison of selenium extraction efficiency from food
supplements

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Eliška Nováková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 18. května 2018.

podpis

Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo porovnání účinnosti extrakce selenu z doplňků stravy obsahujících různé deklarované formy selenu. Pro stanovení účinnosti extrakce byla použita metoda atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací.

Prvním krokem pro stanovení selenu ve čtyřech reálných vzorcích bylo experimentální nalezení optimálních podmínek stanovení selenu technikou plamenové atomizace. Mezi optimalizované parametry patřilo složení plamenu, průtoková rychlost paliva, úhel natočení hořáku, horizontální poloha hořáku a šířka spektrálního intervalu. Při testování složení plamenu byly naměřeny vyšší odezvy s použitím vzduchu jako oxidovadla, a proto byl pro další optimalizace a měření reálných vzorků použit plamen acetylen-vzduch.

Po optimalizaci podmínek byla zjištěna kalibrační závislost a byly vypočteny základní charakteristiky měření. Pro stanovení selenu byla určena mez detekce a stanovitelnosti, opakovatelnost, citlivost a pracovní rozsah. Mez detekce byla $0,12 \text{ mg dm}^{-3}$.

Reálné vzorky tablet doplňků stravy byly mechanicky homogenizovány a převedeny do vodných roztoků, které byly následně za optimálních podmínek analyzovány. Nejvyšší účinnost extrakce, 52,3 %, organické formy selenu byla dosažena v roztoku Trizma hydrochloridu o koncentraci $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ při pH 9. Nejvyšší účinnost extrakce anorganické formy selenu, 37,3 %, byla naměřena v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ při pH 12.

Klíčová slova

Atomová absorpční spektrometrie, plamenová atomizace, selen, optimalizace

Abstrakt

Cieľom bakalárskej práce bolo porovnanie účinnosti extrakcie selénu z doplnkov stravy obsahujúcich rôzne deklarované formy selénu. K stanoveniu účinnosti extrakcie bola použitá metóda atómovej absorpčnej spektrometrie s plameňovou atomizáciou.

Prvým krokom pre stanovenie selénu v štyroch reálnych vzorkách bolo experimentálne zistenie optimálnych podmienok stanovenia selénu technikou plameňovej atomizácie. Medzi optimalizované parametre patrilo zloženie plameňa, prietoková rýchlosť paliva, uhol natočenia horáku, horizontálna poloha horáku a šírka spektrálneho intervalu. Pri testovaní zloženia plameňa boli namerané vyššie odozvy pri použití vzduchu ako okysličovadla, a preto bol pre ďalšiu optimalizáciu a meranie reálnych vzoriek použitý plameň acetylén-vzduch.

Po optimalizácii podmienok bola zistená kalibračná závislosť a boli vypočítané základné charakteristiky merania. Pre stanovenie selénu bol určený limit detekcie a stanoviteľnosti, opakovateľnosť, citlivosť a pracovný rozsah. Limit detekcie bol $0,12 \text{ mg dm}^{-3}$.

Reálne vzorky tabliet doplnkov stravy boli mechanicky homogenizované a prevedené do vodných roztokov, ktoré boli následne pri optimálnych podmienkach analyzované. Najvyššia účinnosť extrakcie, 52,3 %, organickej formy selénu bola dosiahnutá v roztoku Trizma hydrochloridu o koncentrácii $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 9. Najvyššia účinnosť extrakcie anorganickej formy selénu, 37,3 %, bola nameraná v roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 12.

Kľúčové slová

Atómová absorpčná spektrometria, plameňová atomizácia, selén, optimalizácia

Abstract

The aim of this bachelor thesis was comparison of selenium extraction efficiency from food supplements which contain various declared forms of selenium. The method of atomic absorption spectrometry with flame atomization was used to determine the efficiency of the extraction.

The first step for the determination of selenium in four real samples was the experimental finding of optimal conditions for selenium determination by flame AAS technique. Optimized parameters included the flame composition, the fuel flow rate, the angle of burner rotation, the horizontal burner position and the spectral range. During the testing the flame composition, higher responses were measured by using air as an oxidant, and therefore acetylene-air flame was used to other optimize and measure real samples.

After optimization of the conditions, the calibration dependence was determined and the basic characteristics of the measurements were calculated. The detection limit and determination repeatability, sensitivity and operating range were determined for selenium determination. The detection limit was 0.12 mg dm^{-3} .

The real samples of the food supplement tablets were mechanically homogenized and transferred to aqueous solutions, which were subsequently analyzed by the optimal conditions. The highest extraction efficiency 52.3% of the organic selenium was achieved in a 0.10 mol dm^{-3} solution of Trizma hydrochloride at pH 9. The highest extraction efficiency of the inorganic selenium 37.3% was measured in sodium hydroxide solution - concentration of 0.01 mol dm^{-3} at pH 12.

Key words

Atomic absorption spectrometry, flame atomization, selenium, optimization

PodĎakovanie

Touto cestou by som chcela vysloviť vďaku RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. za odborné vedenie mojej bakalárskej práce, za trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval počas samotného merania v laboratóriu, a taktiež za poskytnutie jeho odborných skúseností a rád. V neposlednej rade by som chcela vysloviť vďaku RNDr. Eliške Novákovej, Ph.D. za poradenstvo a konzultácie.

Zároveň by som sa chcela poďakovať aj svojej rodine, ktorá vytvára podmienky pre moje štúdium a počas celého štúdia mi poskytuje veľkú podporu.

Obsah

1	ÚVOD.....	9
1.1	Ciele bakalárskej práce.....	10
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	11
2.1	Atómová absorpčná spektrometria.....	11
2.1.1	Inštrumentácia v AAS.....	12
2.1.2	Optické usporiadanie absorpčného spektrometru	18
2.2	Stanovované prvky.....	19
2.2.1	Selén.....	19
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1	Použité prístroje a vybavenie	24
3.2	Použité chemikálie	24
3.3	Analyzované vzorky.....	24
3.4	Pracovný postup	25
3.4.1	Príprava vzoriek k analýze.....	25
3.4.2	Príprava kalibračných roztokov	27
3.5	Štatistické spracovanie výsledkov.....	27
4	VÝSLEDKOVÁ ČASŤ A DISKUSIA	30
4.1	Optimalizácia experimentálnych parametrov.....	30
4.1.1	Výška horáku	30
4.1.2	Prietoková rýchlosť paliva	31
4.1.3	Uhol natočenia horáku	32
4.1.4	Horizontálna poloha horáku.....	32
4.1.5	Šírka spektrálneho intervalu	33
4.2	Kalibračná závislosť.....	35
4.3	Základné charakteristiky stanovenia	35
4.4	Analýza reálnych vzoriek.....	36
5	ZÁVER.....	39
6	POUŽITÁ LITERATÚRA	40

Zoznam použitých skratiek

A	absorbancia
AAS	atómová absorpčná spektrometria
α	uhol natočenia horáku [°]
c	koncentrácia [$\text{mg dm}^{-3}/\mu\text{g dm}^{-3}$]
ET-AAS	atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou
F-AAS	atómová absorpčná spektrometria s plameňovou atomizáciou
HG-AAS	atómová absorpčná spektrometria spojená s generovaním hydridov
HCL	výbojka s dutou katódou
k_n	tabelovaný koeficient pre výpočet smerodajnej odchýlky
K_n	tabelovaný koeficient pre výpočet intervalu spoľahlivosti
LOD	limit detekcie
LOQ	limit stanoviteľnosti
$L_{1,2}$	interval spoľahlivosti
l	horizontálna poloha horáku [cm]
λ	vlnová dĺžka [nm]
n	počet opakovaných analýz
s	smerodajná odchýlka
s_r	relatívna smerodajná odchýlka
u	prietoková rýchlosť paliva, okysličovadla [ml min^{-1}]
v	šírka spektrálneho intervalu [nm]
\tilde{x}	medián
\bar{x}	aritmetický priemer
x_i	výsledok i -tého merania

1 ÚVOD

Selén je stopový prvok s významnými antioxidačnými vlastnosťami, ktoré spomaľujú proces starnutia a poškodzovania tkanív voľnými radikálmi, minimalizuje vplyv znečisteného prostredia a pôsobí detoxikačne. Taktiež je účinný proti postupujúcim zápalom a bolestiam, ale svoje využitie nájde aj pri prevencii nádorových ochorení a celkovom posilnení imunitného systému. Z dôvodu nevyváženej a nekvalitnej stravy trpí v dnešnej dobe veľká časť ľudskej populácie nedostatkom selénu.

Selén je z toxikologického hľadiska zaujímavá látka, a preto je potrebné zisťovať jeho koncentráciu a možnosti extrakcie v rôznych matriciach. Najčastejšie sa pre stanovenie selénu používa metóda HG-AAS, pri ktorej sa fotochemickou generáciou vytvárajú prchavé zlúčeniny.

Pre stanovenie koncentrácie selénu z roztokov bola v tejto práci použitá atómová absorpčná spektrometria. Touto technikou je možné stanoviť až 68 prvkov, najmä kovov, ale aj niektoré polokovy. Pri použití plameňovej atomizácie sa detekčný limit pohybuje v rozsahu 10^{-1} až 10^2 mg dm⁻³. Výhodou tejto metódy je použitie zdrojov, ktoré poskytujú vlnové žiarenie o vlnovej dĺžke špecifickej pre daný prvok. Nevýhodou je, že v priebehu merania je možné stanoviť iba jeden prvok. Stanovenie množstva analytu je založené na porovnávaní signálu stanovovaného analytu so signálom štandardu.

1.1 Ciele bakalárskej práce

- Optimalizácia podmienok pre stanovenie selénu metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s plameňovou atomizáciou. V tejto práci boli optimalizované parametre merania: zloženie plameňa, výška horáku, prietoková rýchlosť paliva, uhol natočenia horáku, horizontálna poloha horáku a šírka spektrálneho intervalu.
- Príprava kalibračných roztokov a zostrojenie kalibračných závislostí. Následné určenie základných charakteristík merania: limit detekcie, limit stanoviteľnosti, opakovateľnosť, citlivosť a pracovný rozsah.
- Príprava vzoriek pred analýzou zahŕňala váženie, mechanickú, tepelnú a chemickú úpravu. Analýza vzoriek tabliet, určenie koncentrácie selénu po uskutočnení extrakcie.
- Porovnanie účinnosti extrakcie selénu z doplnkov stravy.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Atómová absorpčná spektrometria

Atómová absorpčná spektrometria (AAS) je veľmi citlivá analytická metóda založená na absorpcii elektromagnetického žiarenia emitovaného primárnym zdrojom žiarenia, voľnými atómami nachádzajúcimi sa v plynnom stave [1]. V závislosti na výbere atomizátoru je AAS delená na atómovú absorpčnú spektrometriu s plameňovou atomizáciou (F-AAS), atómovú absorpčnú spektrometriu s elektrotermickou atomizáciou (ET-AAS) a atómovú absorpčnú spektrometriu s generáciou hydridov (HG-AAS) [2].

Vonkajšie elektróny atómov prechádzajú zo svojho základného energetického stavu do niektorého zo stavov excitovaných. Rozdiel energii medzi excitovaným a základným stavom sa rovná absorbovanej energii, ktorá je dodávaná vo forme elektromagnetického žiarenia [3]. Pre dosiahnutie najväčšej citlivosti je metóda AAS založená na Kirchhoffovom zákone: voľné atómy v plynnom skupenstve sú schopné absorbovať elektromagnetické žiarenie len pri takých istých vlnových dĺžkach, pri ktorých sú samy schopné toto žiarenie emitovať [4]. Najčastejšie sa používajú zdroje žiarenia zostrojené z rovnakého prvku ako ten, ktorý chceme stanovovať. Ten svojou emisiou žiarenia poskytne požadované vlnové dĺžky. Absorbovaná je iba časť žiarenia, ktorá svojimi vlnovými dĺžkami odpovedá rezonančným čiaram. [5]. Princípom metódy AAS je schopnosť voľných atómov v plynnom stave absorbovať elektromagnetické žiarenie o určitej vlnovej dĺžke (s presne určenou energiou). Pre každý druh atómov je charakteristická iná hodnota energie fotónov a mieru stanovovaných atómov určuje počet absorbovaných fotónov. Vzťah medzi signálom a koncentráciou v metóde AAS opisuje Labertov-Beerov zákon, ktorý zachycuje vzťah medzi pôvodným tokom žiarenia Φ_0 a tokom žiarenia Φ , zmenšeným absorpciou atómov:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot e^{-\kappa \cdot N \cdot l} \quad (2.1)$$

kde κ je atómový absorpčný koeficient, l je dĺžka absorpčného prostredia a N je počet atómov v jednotke objemu.

Rovnicu pre absorbanciu získame úpravou tejto rovnice:

$$A = \log \Phi_0 / \Phi \quad (2.2)$$

kde A je absorbanca, Φ_0 je pôvodný tok žiarenia a Φ je tok žiarenia zmenšený o absorpciu atómov [4].

Sledovaná absorbanca je podľa Lambertového-Beerového zákona priamo úmerná koncentrácii stanovovaného prvku. Na stanovenie koncentrácie je možné použiť metódu kalibračnej priamky, ktorá je lineárna [5].

2.1.1 Inštrumentácia v AAS

Použitý prístroj je tvorený štyrmi základnými konštrukčnými prvkami, ktoré majú špecifické vlastnosti, vyžadované touto metódou. Konštrukčné prvky sú zoradené v optickej osi za sebou: zdroj primárneho žiarenia, absorpčné prostredie, monochromátor a detekčný systém [6].

Zo zdroja monochromatického žiarenia sledovaného prvku prechádzajú emisné čiary do absorpčného prostredia, kde sa nachádzajú voľné atómy analytu vytvorené atomizátorom. Voľné atómy absorbujú žiarenie určitej vlnovej dĺžky a toto zoslabené žiarenie putuje do monochromátoru, ktorý izoluje emisné čiary primárneho žiarenia. Prúd fotónov (žiarivý tok) sa nakoniec mení v detektore na prúd elektrónov (elektrický prúd) [1].

2.1.1.1 Zdroje primárneho žiarenia

Pri AAS metóde sa používajú čiarové zdroje žiarenia vyžarujúce energiu v úzkych spektrálnych intervaloch. Je tak možné použitie monochromátorov s menším rozlíšením, a metóda tiež poskytuje väčší odstup signálu od pozadia [7]. Medzi najčastejšie využívané zdroje v AAS patrí výbojka s dutou katódou alebo bezelektrodová výbojka. Ďalej sa tiež používajú vysokovýkonné zdroje poskytujúce vyšší rozsah vlnových dĺžok, napr. deutériové a halogénové lampy, alebo vysokotlakové xenónové oblúkové výbojky a polovodičové laserové diódy [8] [9]. Vysokotlaková

xenónová výbojka emituje žiarenie v rozsahu 190 až 850 nm. V spojení so spektrometrom vybaveným monochromátorom s vysokým rozlíšením, napr. monochromátor typu Echelle, je možné analyzovať všetky prvky [7].

Výbojky s dutou katódou (HCL)

Ako dôležitý zdroj žiarenia sa používajú nízkotlakové výbojky s dutou katódou. Sú to sklenené evakuované trubice plnené vzácnym plynom, neónom alebo argónom, s nízkym tlakom 100 až 200 Pa. Vnútri trubice sa nachádzajú dve zatavené kovové elektródy. Katóda má tvar dutého valčeka s vnútorným priemerom 2 až 12 mm a je vyrobená z rovnakého prvku, ktorý chceme stanoviť, alebo aj zo zmesi viacerých kovov. Zvyčajne je použitý hliník alebo meď, pokrytý vrstvou stanovovaného prvku. Anóda je vyrobená zo žiaruvzdorných kovov (Zr, Ti, Ta alebo W) [7]. Výstupné okienka sú zhotovené z rôznych materiálov: z optického kremeňa - pre vlnovú dĺžku menšiu ako 240 nm, z UV skla - pre vlnovú dĺžku väčšiu ako 240 nm a z optického skla Pyrex - pre vlnovú dĺžku väčšiu ako 300 nm. [8]. Použitím žiarenia špecifického pre konkrétny analyzovaný prvok je daná vysoká selektivita metódy, a preto je možné stanoviť koncentrácie jednotlivých prvkov aj bez nutnosti predchádzajúceho delenia. Podmienky excitácie pri nízkom tlaku a teplote zaručujú, že čiarové spektrum je vysoko monochromatické a má pološíрку čiar menšiu ako 0,002 nm. Výbojka je napájaná stabilizovaným prúdovým zdrojom s výstupným napätím asi 400 V [10].

Po pripojení napätia o hodnote 200 až 600 V na elektródy prebehne nízkotlakový dútnavý výboj, ktorým preteká prúd o veľkosti 3 až 25 mA. Atómy vzácneho plynu a elektróny, urýchľované elektrickým poľom, do seba narážajú a dochádza k ionizácii [7] [11]. Kladne nabité ióny plniaceho plynu sú urýchľované elektrickým poľom smerom ku katóde, narážajú do jeho povrchu a vyrážajú z neho voľné atómy kovu. Dochádza tu k tzv. katódovému rozprášeniu. Tieto atómy sú vplyvom zrážok s iónmi inertného plynu alebo s elektrónmi excitované a pri návrate do základného stavu emitujú žiarenie charakteristické pre materiál katódy [7]. Účinnosť katódy (schopnosť vyrážať voľné atómy kovu) je závislá na hmotnosti iónov a ich rýchlosti v plyne. Pre stanovenie väčšiny prvkov sa používa neón, pre ľahké prvky (napr. hliník, vápnik alebo horčík) je používaný argón [8].

Výbojky s dutou katódou môžu slúžiť iba pre stanovenie jedného prvku, čo obmedzuje ich použitie. Moderné spektrometre pracujú s multikatódovými výbojkami, alebo môžu obsahovať sadu výbojok s dutou katódou zoradených na otočnom zásobníku, ktorý je riadený počítačom [7].

Bezelektrodové výbojky (EDL)

Ďalším dôležitým zdrojom žiarenia používaný v AAS je bezelektrodová výbojka. Je zložená zo sklenenej alebo kremennej banky s dĺžkou niekoľko centimetrov a o priemere 5 až 10 mm [7]. Banka je naplnená plniacim plynom, argónom alebo neónom, pri tlaku 30 až 300 Pa, analyzovaným kovom a niektorou jeho prchavou zlúčeninou, najčastejšie halogenidom [12]. Rádiofrekvenčné pole cievky (20 až 50 MHz) vytvára prstencový výboj pri stenách banky, v dôsledku ktorého dochádza k excitácii pár kovu. V porovnaní s HCL má bezelektrodová výbojka omnoho vyššiu intenzitu emitovaného žiarenia. Táto skutočnosť hrá dôležitú úlohu pri stanovení prvkov, ktorých rezonančné čiary ležia v oblasti pod 220 nm (arzén, selén, olovo), kde dochádza k absorpcii žiarenia vzduchom. Bezelektrodovú výbojku je tiež možné využiť aj v atómovej fluorescenčnej spektrometrii [7].

2.1.1.2 Atomizátory

Atomizátor je zariadenie, ktoré dokáže s dostatočnou účinnosťou premeniť vzorky na atómovú paru. Pred analýzou sa vzorka väčšinou prevádza do roztoku [7].

Teplota by sa mala pohybovať medzi 2000 až 3000 °C, musí byť dostatočná na atomizáciu vzorky a zároveň nižšia než energia potrebná k excitácii atómov. Atomizáciu vzorky je možné uskutočniť v plameni, elektrotermicky alebo v kremeňovom atomizátore [5].

AAS s plameňovou atomizáciou (F-AAS)

Pri metóde F-AAS je roztok vzorky kontinuálne po celú dobu stanovovania nasávaný do pneumatického zhmľovaču alebo ultrazvukového rozprašovaču. Plameň

v atomizátore je tvorený horiacou zmesou paliva a okysličovadla. Palivom je najčastejšie acetylén a okysličovadlom vzduch (pre teploty do 2500 K) alebo oxid dusný (do 2900 K). Potrebné plyny sa odoberajú z tlakových fliaš, vzduch zvyčajne z kompresoru [13].

Zhml'ovač môže pracovať napr. na princípe Venturiho dýzy, kedy pomocou prúdenia okysličovadla zúženým miestom dôjde ku zníženiu tlaku a ten spôsobí nasávanie vzorky kapilárou do plameňa, kde vzniká aerosól. Na sklenenej guľičke sa triešia väčšie kvapky, aerosól sa mieša s plameňom a je privádzaný do štrbinového horáku. V plameni atomizátora dochádza k odpareniu rozpúšťadla a k termickému rozpadu zlúčeniny na monoxidy analyzovaného prvku. Atomizácia je spôsobená vplyvom tepelného rozkladu väzby prvok-kyslík a vplyvom reakcie oxidov s radikálmi plameňa (CO, C, C₂, CH, H a v prípade použitia oxidu dusného ako okysličovadla tiež NO a CN) [3]. Veľká časť roztoku vzorky pretečie do odpadu, pretože účinnosť pneumatických zhml'ovačov je iba asi 10 %. Aerosól, ktorý vznikne je navyše 200 až 400 tisíckrát nariadený spaľnými plynmi. Pre analýzu sa použije iba nepatrný podiel analyzovanej vzorky, preto sa plameňové atomizátory používajú iba pri analýzach väčších obsahov analytov vo vzorke [6].

Horák je vyrobený z titánu alebo z jeho zliatiny a podľa druhu plameňa je potrebné zvoliť dĺžku štrbiny horáku, aby bola vždy rýchlosť prúdenia zmesi vyššia, ako rýchlosť horenia. Pre plameň acetylén-vzduch použijeme horák s dĺžkou štrbiny 10 cm, a pre plameň acetylén-oxid dusný s vyššou rýchlosťou horenia iba 5 cm. Dĺžka štrbiny horáku zabezpečuje dostatočnú absorpčnú dráhu, hrúbku absorpčného prostredia, ktorou prechádza žiarenie z výbojky [1].

Spektrometer pre AAS obsahuje prvky pre reguláciu a meranie prietoku paliva a okysličovadla. Nastavením výšky je možné meniť teplotu a zloženie plameňa. Polohu horáku je možné nastaviť horizontálne aj vertikálne. Na základe pokusov je nutné pre každý prvok zistiť optimálnu zónu v plameni danú výškou nad ústím horáku, kde je koncentrácia voľných atómov najvyššia [6]. Zloženie roztoku analytu ovplyvňuje účinnosť generovania atómov v plameni. Preto je dôležité, aby boli roztoky analytu

pripravené konštantným spôsobom. Ak to nie je možné, je nutné použiť metódu štandardného prídavku [5].

AAS s elektrotermickou atomizáciou (ET-AAS)

Pri elektrotermickej atomizácii sa jednorazová dávka vzorky atomizuje v asi 2 cm dlhej kyvete z polykryštalického elektrografitu, ktorá je umiestnená v optickej osi spektrometra. Trubička je vyhrievaná priechodom elektrického prúdu. Vnútny aj vonkajší povrch trubičky je omývaný ochrannou atmosférou, argónom alebo dusíkom, ktorá bráni oxidácii povrchu grafitu vzdušným kyslíkom. Analyzujú sa prevažne kvapalné vzorky o objeme 10 až 40 μl . Vzorka je dávkovaná kapilárkou dávkovača cez otvor v stene trubičky. Teplotný program má tri základné fázy: sušenie (odstránenie rozpúšťadla pri teplote 100 až 120 $^{\circ}\text{C}$), pyrolýza (prevedenie organických látok na anorganické pri teplote 400 až 1000 $^{\circ}\text{C}$) a atomizácia (pri teplote 1800 až 2700 $^{\circ}\text{C}$). Touto metódou je možné analyzovať aj suspenzie a pevné vzorky [7] [8]. Výhodou metódy ET-AAS oproti plameňovej atomizácii je nadávkovanie celého množstva vzorky a zvýšenie citlivosti až o tri rády, je teda možné analyzovať aj koncentrácie nižšie než $\mu\text{g l}^{-1}$ [15].

AAS s generovaním prchavých zlúčenín (HG-AAS)

Metóda je založená na prevádzaní analytu na prchavú látku, ktorú je možné oddeliť od matrice za účelom odstránenia interferencií a zvýšenia citlivosti. Najčastejšie sa jedná o prvky arzén, antimón a selén, ktoré vytvárajú kovalentné väzby s aniónom vodíka (AsH_3 , SbH_3 , SeH_2) [7]. Generácia hydridov je uskutočniteľná viacerými spôsobmi. Jedným zo spôsobov je elektrolytická redukcia na povrchu katódy, vyrobenej z platiny alebo z olova. Na povrchu katódy dôjde k depozícii analytu a jeho redukcii na oxidačný stav nula a následne prebehne reakcia medzi redukovaným analytom a atomárnym vodíkom generovaným na povrchu katódy za vzniku príslušného hydridu [16]. Častejšia je ale metóda chemickej redukcie tetrahydridboritanom sodným (NaBH_4), ktorý v silno kyslom prostredí hydrolyzuje za vzniku atomárneho vodíka a ten redukuje prítomný analyt na hydrid [17]. Tvorba hydridov prebieha v generátore,

ktorého hlavnou súčasťou je peristaltické čerpadlo. Čerpadlo navzájom mieša tri toky: vzorku, alkalický roztok tetrahydridoboritanu sodného a roztok kyseliny chlorovodíkovej. V reakčnej kapiláre prebiehajú reakcie, oddelenie kvapalnej fázy a následná atomizácia plynného hydridu. Atomizácia prechavých hydridov najčastejšie prebieha v kremennej trubici tvaru T, vyhrievanej plameňom horáku AAS. Plynná zmes obsahujúca hydrid a prebytok vodíka je privádzaná postrannou užšou trubicou. Hlavnou trubicou, v ktorej dochádza k atomizácii, prechádza lúč výbojky s dutou katódou [7].

2.1.1.3 Disperzný systém

Disperzný systém, monochromátor, tvorí základnú optickú časť prístroja, ktorý slúži k izolácii vhodnej vlnovej dĺžky z polychromatického zdroja. Skladá sa z disperzného prvku (hranol alebo mriežka) a zo systému prenosu obrazu, ktorý tvorí vstupná štrbina, zrkadlo alebo šošovka, a výstupná štrbina. K rozkladu žiarenia dochádza v dôsledku rôzneho indexu lomu alebo odrazu žiarenia o rôznych vlnových dĺžkach v materiáli hranolu alebo mriežky. Do povrchu mriežky je vyrytá rada rovnako veľkých a od seba rovnako vzdialených rovnobežných vrypov. Disperzia na mriežke je dôsledkom odrazu alebo difrakcie žiarenia a interferencie odrazených ohnutých lúčov. Uhol odrazu je rôzny pre rôzne vlnové dĺžky, takže interferenčné maximá sa vytvárajú pre rôzne vlnové dĺžky v rôznych smeroch. Natáčaním mriežky sa dosiahne toho, aby výstupnou štrbinou prešlo iba žiarenie požadovanej vlnovej dĺžky. Pomocou vstupnej a výstupnej štrbiny je možné regulovať šírku spektrálneho intervalu od 0,1 nm do 2,0 nm. Šírka spektrálneho intervalu sa mení tak, aby spolu s rezonančným žiarením nedopadalo na detektor neabsorbujúce (balastné) žiarenie čiar blízkych vlnových dĺžok. Tým by sa zakrivila koncentračná závislosť absorbancie a neplatil by Bouguerov-Lambertov-Beerov zákon. Kvalitu mriežkového monochromátoru charakterizujú štyri základné charakteristiky: spektrálna čistota, disperzia, rozlíšenie a optická priepustnosť [7].

2.1.1.4 Detekčný systém

Detektory sú zariadenia, ktoré prevádzajú energiu žiarenia na ľahko merateľnú formu energie, najčastejšie na elektrickú energiu. Pre detekciu ultrafialového a viditeľného

žiarenia sa najčastejšie používajú fotoelektrické články založené na vonkajšom (fotónka, fotonásobič) alebo vnútornom (polovodičový detektor) fotoelektrickom efekte [12].

V AAS sa k detekcii toku žiarenia, tesne za výstupnú štrbinu monochromátoru, zaraďuje fotonásobič, ktorého citlivosť je pre sledovanú oblasť spektra dostačujúca. Fotonásobič je uzavretý v puzdre, ktoré neprepúšťa svetlo a je tvorený evakuovanou sklenenou bankou so vstupným otvorom z kremeňa. V sklenej banke sa nachádza fotocitlivá katóda, anóda a systém deviatich až trinástich dynód. Pri dopade fotónov svetelného žiarenia na fotokatódu sú emitované elektróny, ktoré sú urýchľované na nasledujúcej elektróde (dynóde) napätím vloženým medzi dynódu a fotokatódu. Najčastejšie sú v AAS používané fázovo citlivé zosilňovače ladené na frekvencii modulačného žiarenia výbojky. Pri dopade elektrónov na špeciálnu oxidovú vrstvu dynódy dochádza k vyrazeniu sekundárnych elektrónov priťahovaných ďalšou dynódou. Medzi dynódami je udržiavaný potenciálový spád, ktorý zaručuje nárast počtu elektrónov. Tým je získané zosilnenie signálu viac ako 10^6 -krát. Pre priame odčítanie hodnôt absorbancii na lineárnej stupnici je indikačný systém vybavený logaritmickým prevodníkom. AA-spektrometre sú vybavené analógovo-digitálnym prevodníkom a v digitálnej forme je ovládané nastavenie parametrov, automatické vyhodnocovanie výsledkov a štatistika [10].

2.1.2 Optické usporiadanie absorpčného spektrometru

Atómové absorpčné spektrometre pracujú v jednolúčovom alebo dvojlúčovom usporiadaní.

2.1.2.1 Jednolúčové usporiadanie

Jednolúčové prístroje sú zostrojené tak, aby najprv merali neabsorbovanú čiaru a potom absorbovanú [5]. Vďaka jednoduchosti a minimálnym stratám žiarenia je pre prvky, ktorých čiary ležia v oblasti pod 220 nm, možné používať zdroje s nižšou intenzitou. Kolísanie intenzity zdroja primárneho žiarenia a nestabilitu systému

jednolúčové spektrometre nie sú schopné úplne eliminovať, preto je pred meraním dôležité dlhé žhavenie lampy [10].

2.1.2.2 Dvojlúčové usporiadanie

Žiarenie v dvojlúčovom spektrometri je rozdelené na zväzok prechádzajúci plameňom a zväzok vedený mimo plameň [5]. Tieto dva lúče sú získané delením zdrojového žiarenia rotujúceho zrkadlovými segmentami, po prechode atomizátorom sa znovu spoja a dopadajú do vstupnej štrbiny monochromátoru. Rotujúcim modulátorom alebo rotujúcim zrkadlovým modulátorom je zaistené, že v daný čas dopadá na detektor iba žiarenie meraného alebo porovnávacieho lúča. Kolísanie intenzity primárneho zdroja a nestabilita systému je odstránená porovnávaním meraného a porovnávacieho lúča. Nevýhodou je vyššia cena a straty žiarenia primárneho zdroja, ktoré je možné odstrániť použitím primárneho zdroja s vyššou intenzitou žiarenia [10] alebo použitím jednolúčového prístroja s dvojlúčovou charakteristikou. Pred meracou periódou dochádza k odchýleniu merného lúča vedľa absorpčného prostredia, k tomu sa používa Stockdalova optika [8].

2.2 Stanovované prvky

V tejto bakalárskej práci bola pozornosť zameraná na skúmanie tabliet výživových doplnkov stravy, ktoré obsahujú rôzne deklarované formy selénu.

2.2.1 Selén

2.2.1.1 Všeobecná charakteristika

Selén bol objavený v roku 1817 švédskym chemikom J. J. Brezéliusom. Nachádza sa v 4. perióde VI. A skupine periodickej sústavy prvkov. Selén existuje v dvoch formách: v anorganickej forme (jednoduché soli selénu) a v organickej forme (selenometionin a selenocystein). Obe formy sú pre ľudské telo využiteľné ako zdroj selénu [14]. Anorganický selén sa vyskytuje v malých množstvách v zemskej kôre, jeho obsah je asi $0,05 \text{ mg dm}^{-3}$, je prítomný predovšetkým v zmesi s elementárnou sírou.

V prevažnej miere sa nachádza vo forme minerálov, selenidov [19]. Rastliny selén uschovávajú a premieňajú na organické formy, najmä na selenocystein, selenometionin a ich metylované formy [14]. Ľudia, zvieratá aj rastliny často trpia jeho nedostatkom, ale aj nadbytkom. Selén v primeranom množstve je základnou živinou, na druhej strane je jeho nadbytok toxický. Množstvo selénu u ľudí, zvierat aj rastlín je závislé na jeho koncentrácii v pôde v lokalite, v ktorej žijú. Je preto dôležité poznať koncentráciu selénu v pôde. Niektoré rastliny, napríklad kozinec, ho spotrebujú oveľa viac než väčšina ostatných. Takéto rastliny môžu predstavovať pre pasúce sa zvieratá nebezpečenstvo [20].

Prvok selén patrí medzi najťažšie prvky VI. A skupiny, má o dva elektróny menej než príslušný vzácny plyn, kryptón. Selén je polovodič. S väčšinou prvkov sa zlučuje priamo, ale nie tak ľahko ako kyslík a síra. Je známych najmenej šesť rôznych alotropických modifikácií selénu: tri červené monoklinické polymorfné formy (α , β a γ), ktoré sú zložené z kruhu Se_8 a odlišujú sa iba intermolekulárnym zúžením kruhu v kryštáloch. Najťažších z izotopov je ^{82}Se (zastúpený 9,4 %), je to žiarič β^- s extrémne dlhým polčasom rozpadu – $1,4 \cdot 10^{20}$ roka. Najväčšie zastúpenie má izotop ^{80}Se (49,6 %). Všetky izotopy okrem ^{77}Se majú nulový jadrový spin. Izotop ^{77}Se ($I=\frac{1}{2}$, zastúpený 7,6 %) sa stále častejšie používa v NMR-spektroskopii [18].

Tab. 2.1 Niektoré atómové a fyzikálne vlastnosti selénu

Vlastnosti	Hodnoty
Atómové číslo	34
Počet stabilných izotopov	6
Atómová hmotnosť [g/mol]	78,96
Elektrónová konfigurácia	[Ar]3d ¹⁰ 4s ² 4p ⁴
Elektronegativita	2,4
Oxidačné čísla	-II, II, IV , VI
	hexag. 4,189
Hustota [g/cm ³]	α -monokl. 4,389 sklovitý 4,285
Teplota topenia [°C]	217
Teplota varu [°C]	685

2.2.1.2 Príprava a použitie

Hlavným zdrojom priemyselného selénu sú anódové kaly, odpadné látky po rafinácii medi. Obsah selénu v rudách je malý, a preto je ťažba rudy s obsahom selénu ekonomicky neefektívna. Selén je tiež možné izolovať z odpadných kalov pri výrobe kyseliny sírovej a z tzv. lietavého prachu usadzovaného pri pražení sulfidov medi a olova [18].

Spôsoby využitia selénu sa v jednotlivých krajinách odlišujú. Jedným z možných komerčných využití je napríklad v prístrojoch určených na kopírovanie a v laserových tlačiarňach. Dôležitú úlohu tu hrá schopnosť selénu reagovať na svetlo. Fotokopírovacie prístroje obsahujú valec s vrstvou selénu, ktorá v tme plní funkciu izolátora a vo svetle má funkciu vodiča. Valec má statický náboj nasmerovaný na predlohu. Na mieste, kde je predloha jasná, je poťah vodivý a odvedie statický náboj. Tam, kde je predloha tmavá, statický náboj zostane. Následne sa cez bubon nasype veľmi jemný čierny prášok, zachytí sa na mieste, kde zostal statický náboj a vytvorí tak kópiu originálnej predlohy. Papier je otáčaný valcom a zachycuje prášok, ktorý je potom spojený s papierom pomocou horúcich valčekov [20]. Ďalšie využitie selénu, používané v USA, je použitie k odfarbovaniu a k farbeniu skla na ružovú až červenú farbu. Intenzita sfarbenia závisí na množstve a pomere pridaných pevných častíc Cd (S, Se). Cd (S, Se) sa používa aj ako zložka tepelne stálych pigmentov v plastoch, farbách, atramentoch a smaltoch. Selén sa používa aj v metalurgii, malé množstvo feroselénu sa používa pri liatí, kovaní a ďalších spôsoboch opracovania nehrdzavejúcich ocelí. Dithiokarbamat $[\text{Se}(\text{S}_2\text{SNEt}_2)_4]$ sa používa pri spracovaní prírodného a syntetického kaučuku. Selénu má svoje využitie aj vo farmaceutickom priemysle [18]

2.2.1.3 Selén v ľudskom organizme

Selén je stopový prvok, ktorý je pre organizmus v primeraných množstvách nenahraditeľný, ale rovnako ako všetky ostatné prvky, je vo vysokých dávkach toxický [21]. Pokles príjmu selénu v potrave za posledné desaťročia sa odhaduje asi na polovinu. V druhej polovici minulého storočia bol príjem selénu asi 60 – 70 μg na osobu denne, dnes je odhadovaný príjem asi 35 μg denne [22]. Svetová zdravotnícka

organizácia stanovila tabuľku odporúčeného príjmu. Doručená hodnota je udávaná v závislosti na zemepisných rozdieloch, a to v množstve 50 – 200 µg. Odporúčaná denná dávka selénu je jeden µg na kg hmotnosti [23]. Selén je v tele človeka lokalizovaný najmä v mozgu, v srdcovej a v priečne pruhovanej svalovine, v ženských vajíčkach a v mužských semenníkoch. Nadbytočný selén je z tela vylučovaný hlavne močom a stolicou. Biologicky najdostupnejšia forma selénu je organická, ktorá sa resorbuje hlavne v dvanástorníku ako selenometionín a selenocysteín. Vstrebávanie selénu negatívne ovplyvňuje vláknina, metionín, zinok, kadmium a ortuť [24]. Resorbovaný selén je zabudovaný do dôležitých bielkovín, selenoproteínov. V krvi sa v najväčšej miere vyskytuje v selenoproteine P, ale aj v glutathionperoxidáze, ktorá chráni bunky pred poškodením peroxidmi, hlavne peroxidom vodíka a hydroxylovými radikálmi. Menšie množstvo selénu sa tiež nachádza viazané v albumíne. Funkcia selenoproteínu je nie len transportná, ale hlavne enzymatická, v dôsledku pôsobenia selenocysteínu v aktívnych centrách enzýmov [25]. Selenoproteíny môžu znižovať riziko vzniku rakoviny prostaty, pretože sa podieľajú na produkcii testosterónu, ktorý je dôležitým regulátorom rastu prostaty, a tiež zlepšuje činnosť buniek pečene [26]. Selén zvyšuje plodnosť a činnosť štítnej žľazy [24].

Toxicita selénu (selenóza) je vzácna, nastáva až po prekročení dávky asi 300 µg/deň. V miernejších prípadoch sa môže prejaviť zvracaním, chorobnými zmenami pokožky, stratou vlasov a nechtov, únavou a zápachom z úst po cesnaku. Dlhodobé užívanie nadbytku selénu (nad 900 µg/deň) môže viesť k neurologickým zmenám, ako je znížená citlivosť, kŕčovitité záchvaty a dokonca aj ochrnutie. Konzumáciou rozmanitej stravy je človek schopný zaistiť si dostatočný prirodzený príjem selénu z potravy. Hlavnými zdrojmi selénu v potrave je mäso, morské plody a ryby, mliečne výrobky, vajcia, para orechy, cesnak, fazuľa a obilniny. Jeho množstvo však závisí na obsahu selénu v pôde [27].

2.2.1.4 Selén vo výživových doplnkoch stravy

Selén je dostupný v multivitamínových a multiminerálnych doplnkoch stravy a tiež ako samostatný prvok, často vo forme selenometionínu, droždia s vysokým obsahom

selénu, alebo vo forme anorganických solí selénu [28] [29]. Ľudské telo dokáže resorbovať viac ako 90% selenometionínu, ale iba okolo 50% anorganického selénu [29]. Niektoré štúdie porovnávali resorbciu rôznych foriem selénu, avšak zistili, že selén prijímaný formou doplnkov stravy ovplyvňuje iba koncentráciu selénu v plazme, a nie aktivitu glutathionperoxidázy, alebo koncentráciu selenoproteínu P. Navyše takýto druh selénu môže v kombinácii s niektorými liekmi spôsobiť nepriaznivé reakcie [30].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité prístroje a vybavenie

- Atómový absorpčný spektrometer GBC 933 AA s plameňovou atomizáciou (GBC Scientific Equipment, Austrália)
- Výbojka s dutou katódou pre stanovenie selénu (Varian Techtron, Austrália), $\lambda = 196,0 \text{ nm}$, $I = 10 \text{ mA}$
- Analytické váhy 2004 MP (Sartorius, Česká republika)
- Ultrazvukový vodný kúpeľ Elmasonic E 30 H (Elma, Nemecko)

3.2 Použité chemikálie

- Štandardný roztok pre AAS Se^{IV} naviazaný na SRM NIST (oxid seleničitý v kyseline dusičnej $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$) 1000 mg dm^{-3} CertiPUR o koncentrácii $1002 \pm 5 \text{ mg dm}^{-3}$ (Merck, Nemecko)
- HNO_3 , 65% roztok, p. a. (Lach-Ner s.r.o., Česká Republika)
- Hydroxid sodný, p. a., perly (Lach-Ner s.r.o., Česká Republika)
- HCl , 37% roztok (Merck, Nemecko)
- Trizma hydrochlorid, kryštalický (Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Analyzované vzorky

V tejto bakalárskej práci boli analyzované 4 vzorky tabliet výživových doplnkov stravy:

- A. SELZINK PLUS, obsah selénu v tablete je $50 \text{ }\mu\text{g}$ vo forme seleničitanu sodného, dátum expirácie: jún 2018 (PRO.MED.CS Praha a.s., Česká Republika)
- B. Selen, obsah selénu v tablete je $100 \text{ }\mu\text{g}$ v organickej forme, dátum expirácie: marec 2018 (WALMARK, a.s., Česká Republika)

- C. Selen, NATRURE'S BOUNTY, obsah selénu v tablete je 100 μg v organickej forme, dátum expirácie: február 2018 (WALMARK, a.s., Česká Republika)
- D. A-Z Multivitamín komplex, obsah selénu v tablete je 55 μg vo forme selenanu sodného, dátum expirácie: máj 2018 (ABTEI OP Pharma GmbH, Nemecko)

3.4 Pracovný postup

3.4.1 Príprava vzoriek k analýze

Vzorky tabliet boli navážené vcelku a mechanicky rozdrvené v trecej miske. Obalový film z tabliet bol z väčšej časti odstránený. Prášok z rozdrvených tabliet bol zvážený s presnosťou 0,1 mg (viď *Tab. 3.1*) a kvantitatívne prevedený do 50ml odmerných baniek. K naváženiu boli použité analytické váhy 2004 MP Sartorius. Následne boli odmerné banky so vzorkami doplnené jednotlivými roztokmi až po rysku (viď *Obr. 3.1*). Roztok Trizma hydrochloridu bol titrovaný hydroxidom sodným na pH 9. Banky s roztokmi vzoriek boli umiestnené do vodného ultrazvukového kúpeľa s teplotou 35 °C a lúhované po dobu 30 minút. Po vychladnutí baniek bola časť roztoku filtrovaná striekačkou s polyamidovým filtrom (45 μm) do malých kadičiek. Takto spracované vzorky boli pripravené na okamžitú analýzu.

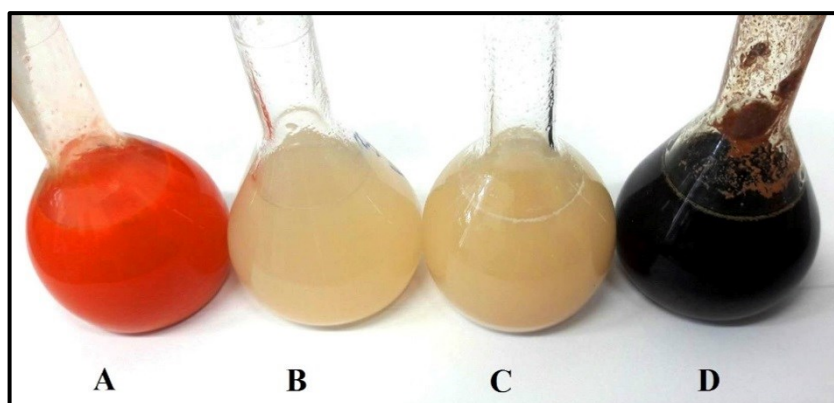
Tab. 3.1: Počet tabliet, hmotnosť celých a navážky rozdrvených tabliet (č. 1-4 – zloženie roztokov viď. Tab. 3.2)

Vzorka	Počet tabliet	$m_{\text{celých}} [\text{g}]$				$m_{\text{rozdrv.}} [\text{g}]$			
		1	2	3	4	1	2	3	4
A	5	3,3546	3,3596	3,3672	3,3568	3,1517	3,2580	3,2427	3,2982
B	3	0,9964	0,9957	3,2427	0,9971	0,9556	0,9471	0,9589	0,9509
C	3	1,4014	1,4074	1,015	1,4082	1,3463	1,3309	1,3552	1,3753
D	5	5,9679	5,9103	-	-	5,7026	5,8090	-	-

Tab. 3.2: Zloženie roztokov použitých pre extrakciu a lúhovanie selénu z reálnych vzoriek tabliet doplnkov stravy

Číslo roztoku	Roztok	c [mol dm ⁻³]	pH
1	HNO ₃	0,01	2
2	HCl	0,01	2
3	NaOH	0,01	12
4	TRIS + hydroxid	0,10	9

Vzorku D nebolo možné analyzovať metódou F-AAS. Obsahovala príliš veľa tuhých častí a filtráciou vznikol gél, ktorý by mohol upchať kapiláru prístroja (viď Obr. 3.2).



Obr. 3.1: Roztoky vzoriek pred filtráciou



Obr. 3.2: Roztok vzorky D

3.4.2 Príprava kalibračných roztokov

Pre určenie základných charakteristík merania a stanovenie obsahu selénu v reálnych vzorkách bol pripravený súbor kalibračných roztokov s koncentráciami 1,0; 2,5; 5,0 a 10,0 mg dm⁻³. Roztoky boli pripravené zo štandardného roztoku selénu o koncentrácii 1000 mg dm⁻³ nariadením deionizovanou vodou po rysku odmernej banky.

3.5 Štatistické spracovanie výsledkov

Pre zabezpečenie dostatočnej presnosti merania v tejto práci bolo každé meranie opakované trikrát. Štatistické spracovanie výsledkov bolo uskutočnené podľa nasledujúceho postupu.

Medián, \tilde{x}

Medián určuje strednú hodnotu nameraných výsledkov. Pri nepárnom a malom počte výsledkov ($n < 7$) sa zoradia od najmenšieho po najväčší, medián bude hodnota nachádzajúca sa uprostred rady. Pri párnom počte výsledkov je medián priemer dvoch prostredných hodnôt.

Aritmetický priemer, \bar{x}

Aritmetický priemer je súčet všetkých hodnôt daného súboru vydelený ich počtom.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.1)$$

Rozpätie výsledkov, R

Rozpätie výsledkov je rozdiel medzi najväčšou a najmenšou hodnotou daného súboru.

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (3.2)$$

Smerodajná odchýlka, s

Pre počet paralelných stanovení ($n < 20$) sa smerodajná odchýlka vypočíta podľa vzorca:

$$s = k_n \cdot R \quad (3.3)$$

Relatívna smerodajná odchýlka, s_r

Relatívna smerodajná odchýlka je podiel smerodajnej odchýlky a mediánu.

$$s_r = s / \tilde{x} \quad (3.4)$$

Interval spoľahlivosti, $L_{1,2}$

Interval, ktorý s pravdepodobnosťou 95 % udáva, kde leží skutočná hodnota výsledkov.

$$L_{1,2} = K_n \cdot R \quad (3.5)$$

Výsledok sa udáva v tvare: $\tilde{x} + L_{1,2}$

Limit detekcie, LOD

Limit detekcie je minimálna koncentrácia stanovovanej látky, ktorej signál je štatisticky odlišiteľný od šumu.

$$\text{LOD} = \tilde{x} + 3 \cdot s \quad (3.6)$$

Limit stanoviteľnosti, LOQ

Limit stanoviteľnosti je koncentrácia, pri ktorej je presnosť stanovenia dostatočná pre kvantitatívne vyhodnotenie.

$$\text{LOQ} = \tilde{x} + 10 \cdot s \quad (3.7)$$

Citlivosť

Citlivosť metódy je zmena odozvy meracieho zariadenia, ktorá odpovedá zmene podnetu. Citlivosť je lineárna závislosť rovná smernici kalibračnej závislosti. Ak kalibračná závislosť nie je lineárna, s koncentráciou analytu sa mení citlivosť.

Opakovateľnosť

Opakovateľnosť vyjadruje ako veľmi sú si výsledky opakovaného merania rovnakého analytu podobné. Merania musia byť uskutočnené na rovnakom prístroji, na rovnakom mieste, rovnakým postupom merania, rovnakým personálom a pri rovnakých podmienkach v krátkom časovom intervale.

$$O = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 10 \quad (3.8)$$

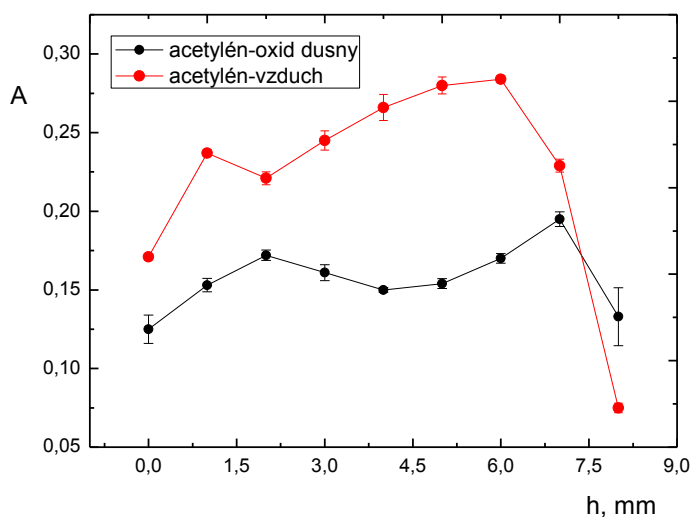
4 VÝSLEDKOVÁ ČASŤ A DISKUSIA

V tejto časti bakalárskej práce sú diskutované optimalizácie plameňovej atomizácie a zhrnutie základných charakteristík merania. Ďalej sú prezentované výsledky stanovenia selénu v reálnych vzorkách a porovnanie účinnosti extrakcie.

4.1 Optimalizácia experimentálnych parametrov

4.1.1 Výška horáku

V prvej fáze merania bolo testované, aké zloženie plameňa je najvhodnejšie pre stanovenie koncentrácie selénu v roztoku. Hodnoty absorbancie roztoku s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$ boli merané pri rôznych výškach horáku a rôznom zložení plameňa. Prvé meranie bolo prevedené v plameni zloženom z paliva - acetylénu a z okysličovadla - oxidu dusného. Dĺžka horáku bola 6 cm. Následne bola zmeraná absorbancia v plameni, kde bol namiesto okysličovadla, oxidu dusného, použitý vzduch, s dĺžkou horáku 10 cm. Obidve závislosti sú zobrazené na Obr. 4.1.



Obr. 4.1: Závislosť absorbancie na výške horáku a zložení paliva

$$c_{\text{Se}} = 50,0 \text{ mg dm}^{-3}, \lambda_{\text{Se}} = 196,0 \text{ nm}, \nu = 1,0 \text{ nm}, u_{\text{acetylén}} = 3,5 \text{ ml min}^{-1},$$

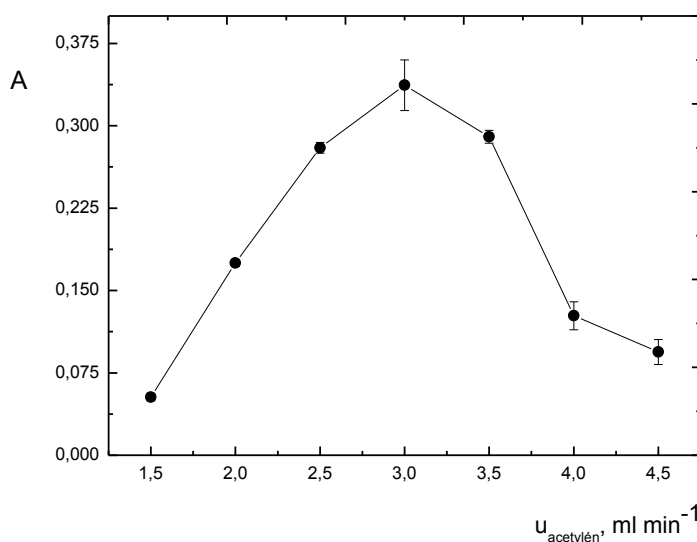
$$u_{\text{oxid dusný}} = 5,5 \text{ ml min}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 2,0 \text{ ml min}^{-1}$$

Čiernou farbou je znázornená závislosť absorbancie na výške horáku pri použití plameňa acetylén-oxid dusný. Červenou farbou je znázornená závislosť absorbancie na výške horáku pri použití plameňa acetylén-vzduch. Na základe hodnôt získaných z merania, z dôvodu zistenia vyššej odozvy pre plameň acetylén-vzduch, bol následne pre stanovenia koncentrácií štandardov a reálnych vzoriek použitý plameň acetylén-vzduch.

K optimalizácii výšky lúča nad hranou horáku bol použitý zásobný roztok selénu s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Závislosť absorbancie na jednotlivých polohách horáku bola premeraná v rozmedzí polôh horáku 0 až 8 mm. Výsledky optimalizácie sú zobrazené na Obr. 4.1. Najvyššia absorbancia bola nameraná pri výške horáku 6 mm. Táto výška bola z dôvodu dosiahnutia najvyššej odozvy používaná pri ďalšom vlastnom meraní.

4.1.2 Prietoková rýchlosť paliva

Ako palivo bol použitý acetylén. V ďalšom postupe bola pri optimalizovanej výške horáku, 6 mm, zmeraná závislosť absorbancie na prietokovej rýchlosti paliva. K optimalizácii prietokovej rýchlosti bol použitý zásobný roztok selénu s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Prietoková rýchlosť bola meraná v rozmedzí $1,5$ až $4,5 \text{ ml min}^{-1}$. Výsledky optimalizácie prietokovej rýchlosti paliva sú uvedené na Obr. 4.2.



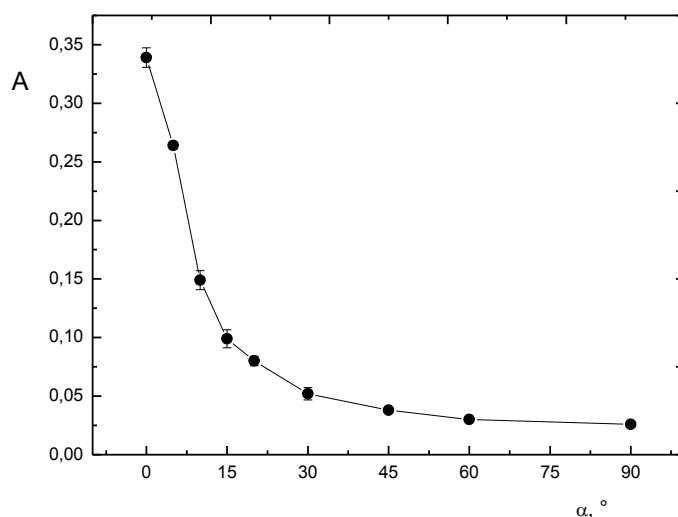
Obr. 4.2: Závislosť absorbancie na prietokovej rýchlosti paliva

$c_{\text{Se}} = 50,0 \text{ mg dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{Se}} = 196,0 \text{ nm}$, $\nu = 1,0 \text{ nm}$, $u_{\text{vzduch}} = 2,0 \text{ ml min}^{-1}$, $h = 6 \text{ mm}$

Rýchlosť prietoku paliva, pri ktorom bola nameraná najvyššia absorbancia ($3,0 \text{ ml min}^{-1}$), bola následne používaná pre vlastné meranie.

4.1.3 Uhol natočenia horáku

K optimalizácii uhlu natočenia horáku bol použitý zásobný roztok selénu s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Uhol bol zmeraný v rozmedzí 0° až 90° , pri výške horáku 6 mm a prietokovej rýchlosti paliva $3,0 \text{ ml min}^{-1}$. Výsledky optimalizácie uhlu natočenia horáku sú znázornené na Obr. 4.3.



Obr. 4.3: Závislosť absorbancie na uhle natočenia horáku

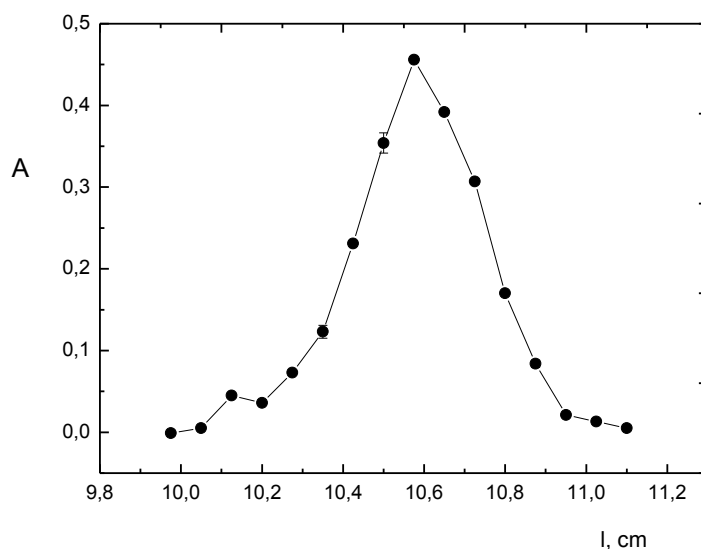
$$c_{\text{Se}} = 50,0 \text{ mg dm}^{-3}, \lambda_{\text{Se}} = 196,0 \text{ nm}, \nu = 1,0 \text{ nm}, u_{\text{acetylén}} = 3,0 \text{ ml min}^{-1}, \\ u_{\text{vzduch}} = 2,0 \text{ ml min}^{-1}, h = 6 \text{ mm}$$

Uhol, pri ktorom bola hodnota absorbancie najvyššia (uhol 0°), bol ďalej používaný pri vlastnom meraní.

4.1.4 Horizontálna poloha horáku

Optimalizovanie horizontálnej polohy horáku predstavuje nastavenie ideálnej polohy štrbiny horáku pod lúčom vychádzajúcim z primárneho zdroja žiarenia. K optimalizácii horizontálnej polohy horáku bol použitý zásobný roztok s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$,

pri nastavenej výške horáku 6 mm, pri prietokovej rýchlosti $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ a pri uhle natočenia horáku 0° . Meranie bolo vykonané v rozmedzí 9,9 cm až 11,8 cm, kde jedna otáčka predstavovala 0,075 cm. Výsledné hodnoty optimalizácie sú uvedené na Obr. 4.4.



Obr. 4.4: Závislosť absorbancie na horizontálnej polohe horáku

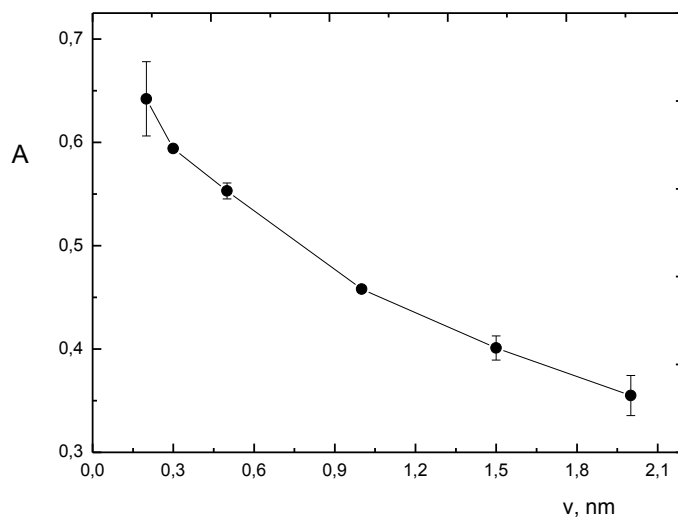
$$c_{\text{Se}} = 50,0 \text{ mg dm}^{-3}, \lambda_{\text{Se}} = 196,0 \text{ nm}, \nu = 1,0 \text{ nm}, u_{\text{acetylén}} = 3,0 \text{ ml min}^{-1}, \\ u_{\text{vzduch}} = 2,0 \text{ ml min}^{-1}, h = 6 \text{ mm}$$

Horizontálna poloha horáku (10,6 cm), pri ktorej bola zmeraná najvyššia hodnota absorbancie, bola použitá pri vlastnom meraní.

4.1.5 Šírka spektrálneho intervalu

Šírka spektrálneho intervalu monochromátoru bola optimalizovaná pomocou zásobného roztoku selénu s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Meranie prebiehalo pri vyššie optimalizovaných podmienkach, výška horáku 6 mm, prietoková rýchlosť plameňa $3,0 \text{ ml min}^{-1}$, pri uhle natočenia horáku 0° a pri horizontálnej polohe horáku 10,6 cm. Výsledky merania sú znázornené na Obr. 4.5. Z grafu je zjavné, že najvyššia hodnota absorbancie bola nameraná pri spektrálnom intervale 0,2 nm. Z dôvodu nízkej intenzity

žiarenia a veľkej smerodajnej odchýlky bol pre ďalšie vlastné merania používaný spektrálny interval 0,5 nm.



Obr. 4.5: Závislosť absorbancie na spektrálnom intervale monochromátoru

$$c_{\text{Se}} = 50,0 \text{ mg dm}^{-3}, \lambda_{\text{Se}} = 196,0 \text{ nm}, u_{\text{acetylén}} = 3,0 \text{ ml min}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 2,0 \text{ ml min}^{-1}, \\ h = 6 \text{ mm}$$

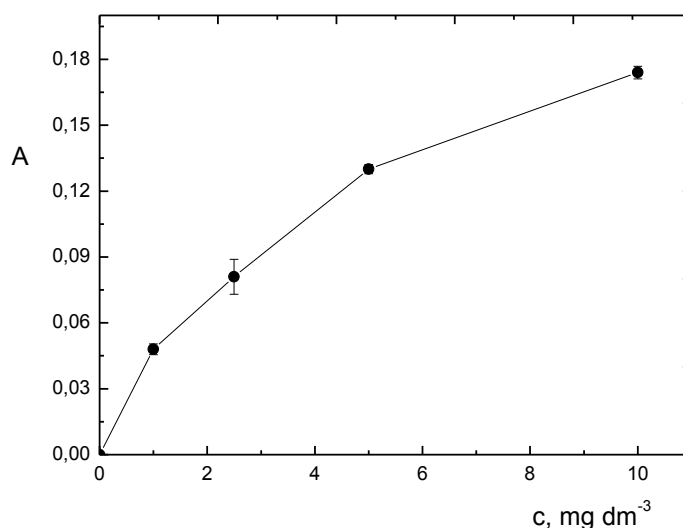
Optimalizované parametre a najvyššie hodnoty absorbancie pre optimalizačný roztok selénu s koncentráciou $50,0 \text{ mg dm}^{-3}$ sú uvedené v Tab. 4.1.

Tab. 4.1: Optimalizované parametre ($c_{\text{Se}} = 50,0 \text{ mg dm}^{-3}$)

Optimalizácia	Výška horáku [mm]	Prietoková rýchlosť paliva [ml min ⁻¹]	Uhol natočenia horáku [°]	Horizontálna poloha horáku [cm]	Spektrálny interval [nm]
Hodnota	6,0	3,0	0	10,6	0,5
Absorbancia	0,284	0,337	0,339	0,456	0,553

4.2 Kalibračná závislosť

Po nastavení optimálnych podmienok metódy boli zmerané kalibračné roztoky s koncentráciami 1,0; 2,5; 5,0 a 10,0 mg dm⁻³. Z nameraných hodnôt signálov bola zostrojená kalibračná závislosť absorbancie na koncentrácii štandardov (vid' Obr. 4.6).



Obr. 4.6: Závislosť absorbancie na koncentrácii selénu

$$\lambda_{\text{Se}} = 196,0 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, u_{\text{acetylén}} = 3,0 \text{ ml min}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 2,0 \text{ ml min}^{-1}, h = 6 \text{ mm}$$

4.3 Základné charakteristiky stanovenia

Po definovaní optimálnych podmienok a kalibračných závislostí pre samotné meranie boli následne spracované štatistické údaje potrebné k určeniu charakteristiky danej metódy. Bol stanovený limit detekcie, limit stanoviteľnosti, opakovateľnosť, citlivosť a pracovný rozsah. K určeniu týchto parametrov bol zvolený roztok selénu s vhodnou koncentráciou a tiež bola využitá kalibračná závislosť pre selén. Výsledky sú zhrnuté v Tab. 4.2.

Limit detekcie a limit stanoviteľnosti boli vypočítané z údajov získaných meraním kalibračného roztoku selénu s koncentráciou 2,5 mg dm⁻³. Tento roztok bol v krátkom časovom intervale zmeraný desaťkrát.

Opakovateľnosť bola vypočítaná z údajov získaných meraním kalibračného roztoku selénu s koncentráciou $10,0 \text{ mg dm}^{-3}$, ktorý bol v krátkom časovom intervale zmeraný desaťkrát.

Citlivosť a pracovný rozsah danej metódy bol určený z grafu kalibračnej závislosti.

Tab. 4.2: Zhrnutie základných charakteristík stanovenia selénu technikou F-AAS

Charakteristika	Se
Limit detekcie [mg dm^{-3}]	0,12
Limit stanoviteľnosti [mg dm^{-3}]	0,41
Opakovateľnosť [%]	3,80
Citlivosť [l mg^{-1}]	0,048
Pracovný rozsah do [mg dm^{-3}]	10,0

4.4 Analýza reálnych vzoriek

Vyššie uvedené optimálne podmienky stanovenia boli v závere práce využité pri analýze reálnych vzoriek tabliet výživových doplnkov stravy. Pôvodne boli k analýze použité štyri vzorky (vid' *Tab. 3.1*). Jedna vzorka, označená ako D, nebola vhodná k analýze metódou F-AAS. Dôvodom vylúčenia vzorky z ďalšieho merania bolo veľké množstvo pevných častíc, tvorba gélu po filtrácii a riziko upchania kapiláry meracieho prístroja. Z roztokov jednotlivých vzoriek bola zistená absorbancia, ktorá bola pomocou kalibračnej závislosti prepočítaná na koncentráciu selénu v mg dm^{-3} . Koncentrácia bola následne prepočítaná na obsah vzorky v jednej tablete a účinnosť extrakcie bola porovnaná oproti deklarovanému obsahu selénu vo vzorkách tabliet. Výsledné hodnoty absorbancií a koncentrácií vo vzorkách v jednotlivých roztokoch sú uvedené v *Tab. 4.3*, *4.4*, *4.5* a *4.6*. Koncentrácia vzorky A pri stanovení, ktorá bola lúhovaná a extrahovaná v roztoku kyseliny dusičnej o koncentrácii $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, bola pod limitom stanoviteľnosti. Výsledky účinnosti extrakcie sú uvedené v *Tab. 4.7*.

Tab. 4.3: Výsledky stanovenia selénu v roztoku NaOH s koncentráciou $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$

Vzorka	Koncentrácia [mg dm^{-3}]	Obsah Se v 1 tablete [μg]
A	1,750	18,63
B	1,188	20,64
C	0,688	11,94

Tab. 4.4: Výsledky stanovenia selénu roztoku HNO_3 s koncentráciou $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$

Vzorka	Koncentrácia [mg dm^{-3}]	Obsah Se v 1 tablete [μg]
A	0,262	2,70
B	0,892	15,63
C	1,308	23,53

Tab. 4.5: Výsledky stanovenia selénu v roztoku HCl s koncentráciou $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$

Vzorka	Koncentrácia [mg dm^{-3}]	Obsah Se v 1 tablete [μg]
A	1,065	11,06
B	1,097	19,10
C	2,451	42,40

Tab. 4.6: Výsledky stanovenia selénu v roztoku TRIS + hydroxid s koncentráciou $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$

Vzorka	Koncentrácia [mg dm^{-3}]	Obsah Se v 1 tablete [μg]
A	1,000	10,18
B	1,290	22,54
C	3,065	52,31

Tab. 4.7: Účinnosť extrakcie selénu z tablet

Vzorka	Účinnosť extrakcie [%]			
	<i>V roztoku NaOH</i>	<i>V roztoku HNO₃</i>	<i>V roztoku HCl</i>	<i>V roztoku TRIS + hydroxid</i>
A	37,3	5,4	22,12	20,4
B	20,6	15,6	19,1	22,5
C	11,9	23,5	42,4	52,3

Z nameraných výsledkov je zrejmé, že najvyššia účinnosť extrakcie bola zaznamenaná u organickej formy selénu (vo vzorke C) v roztoku Trizma hydrochloridu s koncentráciou $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 9 a dosahovala hodnotu 52,3 %. Najvyššia účinnosť anorganickej formy selénu (vo vzorke A) bola nameraná v roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 12 a dosahovala hodnotu 37,3 %. Naopak, najnižšia účinnosť extrakcie organickej formy selénu (vo vzorke C) bola v roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 12 a taktiež anorganickej formy selénu (vo vzorke A) v roztoku kyseliny dusičnej s koncentráciou $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 2 dosiahla účinnosť extrakcie 5,4 %. Vzorka B obsahujúca organickú formu selénu dosiahla najvyššiu účinnosť extrakcie 22,5 % v roztoku Trizma hydrochloridu s koncentráciou $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH 9.

5 ZÁVER

Zameraním tejto bakalárskej práce bolo porovnanie účinnosti extrakcie selénu metódou atómovej absorpčnej spektrometrie s plameňovou atomizáciou. V práci boli analyzované reálne vzorky tabliet doplnkov stravy, ktoré obsahovali rôzne deklarované formy selénu.

Pre stanovenie selénu boli zistené optimálne podmienky, ktoré boli uplatnené pri stanovení reálnych vzoriek. V prvej časti merania bolo testované vhodné zloženie plameňa. Výsledkom bolo, že vyššie odozvy boli zistené pri použití plameňa zloženého z paliva - acetylénu a z okysličovadla - vzduchu. Najvyššia odozva pri optimalizácii výšky horáku bola nameraná pri výške 6 mm. Prietoková rýchlosť dosahovala najvyššiu hodnotu odozvy pri prietoku paliva 3 ml min^{-1} . Najvyššia hodnota signálu bola zaznamenaná pre uhol natočenia horáku 0° a pri horizontálnej polohe horáku 10,6 cm. Z dôvodu nízkej intenzity žiarenia a veľkej smerodajnej odchýlky bol pri ďalšom meraní použitý spektrálny interval 0,5 nm, namiesto pôvodnej hodnoty 0,2 nm. Pri optimálnych podmienkach boli následne určené základné charakteristiky stanovenia, ktoré sú uvedené v *Tab. 4.2*.

V záverečnej časti práce boli reálne vzorky tabliet prevedené do roztokov, v ktorých boli lúhované a extrahované. Roztoky boli filtrované a následne analyzované. Z dôvodu nevyhovujúceho zloženia bola jedna vzorka z ďalšej analýzy vylúčená. Analyzované boli tri vzorky tabliet, ktoré obsahovali anorganickú a organickú formu selénu.

Na základe uskutočnených experimentov je možné konštatovať, že optimalizovaná metóda stanovenia selénu pomocou plameňovej atomizácie je vhodná k porovnaniu účinnosti extrakcie, pretože má dostatočný detekčný limit.

Z nameraných hodnôt je zrejmé, že nami navrhnuté činidlá sú charakteristické rozdielnou účinnosťou, ktorá v najlepšom prípade dosahuje 52,3 %. Z tohoto dôvodu nie je možné jednoznačne rozhodnúť, aké podmienky sú najvhodnejšie pre stanovenie anorganických a organických foriem selénu z doplnkov stravy.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Kellner, R.; Mermet, J.-M.; Otto, M.; Valcárcel, M.; Widmer, H.M.: *Analytical Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany 1999
- [2] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, vyd. Karolinum 1997
- [3] Kolektiv: *Analytická chemie 2*. SNTL Praha 1980
- [4] Milata, V.; Segľa, P.: *Spektrálne metódy v chémii*. Bratislava, vyd. STU Bratislava 2004
- [5] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vydání, Ostrava, nakladatelství Pavel Klouda 2003
- [6] Soruraddin, M. H.; Heydari, R.; Puladvand, M. M.; Zahedi, M.: A New Spectrophotometric Method for Determination of Selenium in Cosmetic and Pharmaceutical Preparations after Preconcentration with Cloud Point Extraction. *International Journal of Analytical Chemistry* (2011)
- [7] Záruba, K. a kol.: *Analytický chemie 2. díl*. VŠCHT Praha 2016
- [8] Komárek, J.: *Atomová absorpční spektrometrie*. Brno, Masarykova univerzita 2000
- [9] Welz, B.: Atomic absorption spectrometry - pregnant again after 45 years. *Spectrochimica Acta part B* **54**, 2081-2094 (1999)
- [10] Černohorský, T.; Jandera, P.: *Atomová spektrometrie*. Univerzita Pardubice 1997
- [11] Rubeška, I.; Moldan, B.: *Atomová absorpční spektrometrie*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury 1967
- [12] Operak, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. nakladatelství Karolinum 2010

- [13] Kirkbright, G. F.; Ranson, L.; Use of the Nitrous Oxide-Acetylene Flame for Determination of Arsenic and Selenium by Atomic Absorption Spectrometry. *AMERICAN CHEMICAL SOC, WASHINGTON, DC, Analytical chemistry* **43**:10, 1238-1241 (1971)
- [14] Bowman, B.; Russell, R.: *Present Knowledge in Nutrition*, 9th ed, International Life Sciences Institute, Washington DC 2006
- [15] Shaltout, A. A.; Castilho, I. N.B.; Welz, B.; Carasek, E.; Gonzaga Martense, I. B.; Martensf, A.; Cozzolinog, S. M.F.: Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* **85**, 1350-1356 (2011)
- [16] Shaltout, A. A.; Castilho, I. N. B.; Welz, B.; Carasek, E.; Gonzaga Martens I. B.; Martens, A.; Cozzolino, S. M. F.: Determination of trace selenium in urine by derivative hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences* **18**, 603-605 (2002)
- [17] Shishova, A.; Wieczorek, M.; Kościelniak, P.; Dudek-Adamska, D.; Telka, A.; Moskvina, L.; Bulatova, A.: An automated continuous homogeneous microextraction for the determination of selenium and arsenic by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **181**, 359-365 (2018)
- [18] Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: *Chemistry of the Elements*, Oxford, Pergamon Press Plc, 1984
- [19] Pyrzyńska, K.: Speciation of selenium compounds. *Analytical Sciences* **14**, 479-483 (1998)
- [20] Gray, T.: *Prvky*. Nakladatelství Slovart, s.r.o. 2012
- [21] Oregon State University, Linus Pauling Institute: *Micronutrient Research for Optimum Health*. [on-line]. Dostupné z URL: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium> [cit. 10. 3. 2018]

- [22] FAO/WHO: *Požiadavky človeka na vitamíny a minerálne látky*. Správa z konzultácie expertov, Bangkok Thajsko (2002) [on-line]. Dostupné z URL: <<http://www.fao.org/docrep/004/Y2809E/y2809e0l.htm>> [cit. 10. 3. 2018]
- [23] Scientific Committe on Food: *Opinion of the Scientific Committee on Foof on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium*. (2000) [online]. Dostupné z URL: <https://ec.europa.eu/food/sci-com/scf_en> [cit. 10. 3. 2018]
- [24] Zachar, D.: *Humánna výživa*. Technická univerzita vo Zvolene 2003
- [25] Zima, T. a kol.: *Laboratorní diagnostika*. Vyd. Praha: Galén 2013
- [26] WCRF/AICR: *Food, nutrition, activity and the prevention of cancer*. Washington DC (2007) [on-line]. Dostupné z URL: <<http://www.dietandcancerreport.org>> [cit. 10. 3. 2018]
- [27] Zadák, Z.: *Magnézium a ďalší minerály, vitamíny a stopové prvky ve službách zdraví*. Břeclav: Adamira 2010
- [28] Coates, P.; Betz, J.; Blackman, M.: *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 2nd ed., Informa Healthcare, London and New York 2010
- [29] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board: *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academy Press, Washington DC 2000
- [30] National Institutes of Health: *Selenium*. (2018) [online]. Dostupné z URL: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>> [cit. 31. 3. 2018]